

⑩ 日本国特許庁 (J P) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 昭60-222768

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和60年(1985)11月7日
 G 01 N 33/50 H-8305-2G
 C 12 Q 1/00 8213-4B
 G 01 N 21/78 6637-2G 審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 歯根膜の病気の検出のための唾液診断試験

⑯ 特 願 昭60-35409

⑰ 出 願 昭60(1985)2月26日

優先権主張 ⑱ 1984年2月27日 ⑲ 米国 (U S) ⑳ 584013

㉑ 発 明 者 スータン ビー シヤ アメリカ合衆国コネチカット州セルトン リーナー ドラ
 ー イブ 19

㉒ 発 明 者 バンナ アール チャ アメリカ合衆国コネチカット州モンロー スピニング ホ
 ウドハリ イール ロード 17

㉓ 出 願 人 リチャードソナーヴィ アメリカ合衆国06897コネチカット州ウルトン ウェス
 ックス インコーポレ トポートロード10
 ーテツド

㉔ 代 理 人 弁理士 佐々井 弥太郎 外1名

明 細 書

1. 発明の名称 歯根膜の病気の検出のための唾液
 診断試験

2. 特許請求の範囲

1. 炎症性の歯根膜の病気にかかった疑いのある
 人の唾液試料を、pH 約 4~9 に緩衝した4-アミノ
 アンチピリンとフェノールの水溶液及び過酸化水
 素溶液と共に混合し、上記病気の存在を指示する
 ものとして生じる色を観察することからなる、炎
 症性の歯根膜の病気にかかった疑いのある人のそ
 の病気の存在を検出する方法。

2. 上記 pH が約 6.8である特許請求の範囲第1
 項に記載の方法。

3. 炎症性の歯根膜の病気にかかった疑いのある
 人からの唾液試料の単位容量を本質的に次のもの
 からなる約 2~15単位容量のクロモゲン溶液

% (重量/容量)

4-アミノアンチピリン 0.001-0.15g

フェノール 0.015-1.5g

KH₂PO₄ (モノベーシック) 0.15-12.0g

K₂HPO₄ (ジベーシック) 0.15-13.0g

水 (十分量) 100 ml

及び約 0.1 ~ 2 単位容量の本質的に次のものから
 なる基質溶液

% (重量/容量)

過酸化水素 (30%) 0.001-10 ml

水 (十分量) 100 ml

と混合し、上記病気の存在を指示するものとして
 生じる色を観察することからなる炎症性の歯根膜
 の病気にかかった疑いある人のその病気の存在を
 検出する特許請求の範囲第1項に記載の方法。

4. 上記クロモゲン溶液が本質的に

% (重量/容量)

4-アミノアンチピリン 0.088g

フェノール 0.55g

KH₂PO₄ (モノベーシック) 5.98g

K₂HPO₄ (ジベーシック) 8.27g

水 (十分量) 100 ml

からなるものであり、

上記基質溶液が本質的に

% (重量/容積)

過酸化水素 (30%)	0.1 ml
水 (十分量)	100 ml

からなるものである特許請求の範囲第3項に記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔発明の属する技術分野〕

例えば歯根膜炎、口内炎、歯肉炎などような歯根膜の病気は、普通は局所的な過敏(刺激)による炎症性の口組織変化によって特徴付けられる口の炎症症状である。破壊的な炎症過程は細菌、食物のかす、口の白血球及び歯の周りの上皮附加装置、及び歯根膜の間の相互作用を含み、その結果骨吸収(歯の根の周りの支持骨)、及び上皮附加装置よりも上の部分(歯肉の表面と上皮附加装置のみの間)を含めて、人の歯のすぐ周りの組織(歯肉)の炎症を生じる。そのような炎症症状の早期検出は適正な歯科治療にとって非常に重要である。そのような検出は、炎症位置に於いて体は多形核の白血球(PMN)のなどの白血球の増加を生じ、こ

特開昭60-222768(2)

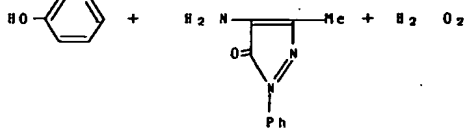
れらは炎症性歯根膜の病気の存在を検出するのに良好な指標であるパーオキシダーゼ酵素を含んでいる、という既知の事実を利用して達成される。炎症症状が存在するときにPMN白血球計数は増加しそれに伴ってパーオキシダーゼ酵素活性が増加する。

〔問題を解決する手段〕

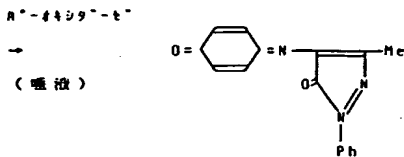
本発明は歯根膜の病気に基づく炎症の存在を検出するための簡単な唾液試験をあたえる。これは、無色の酵素供与体(即ちクロモゲン)を色の付いた生成物へ酸化することを触媒する、既知のパーオキシダーゼの化学的能力を利用するが、これは比色計で測定することができる。本発明のパーオキシダーゼによる試験方法は迅速で、信頼性がある、唾液試料中のパーオキシダーゼ存在とそのような病気の存在の間に強い陽性の相関関係がある。

パーオキシダーゼ活性の測定は結合剤としてフェノールも含んでいる緩衝化された水溶液中の、過酸化水素及びクロモゲンとしての4-アミノアン

チピリンの試薬混合物で達成される。4-アミノアンチピリンは過酸化水素によって、唾液試料からのパーオキシダーゼの存在下で酸化され、生じる色の形成(桃色〜赤)の強さが酵素濃度と比例し、従って歯根膜炎症のひどさと比例する。関与する化学反応は次の様に説明される。



フェノール 4-アミノアンチピリン 過酸化水素
(結合剤) (クロモゲン) (基質)



キノンイミン色結体(クロモゲン)

吸収波長 500 nm ± 15 nm

この反応は測定した量のクロモゲンと基質の溶

液を測定した量の唾液と混合することによって実施される。混合の順序が、先ず第一にクロモゲンと基質溶液を混合して進行させ、次にこれに唾液の混合物を加えるか、又は別の方法としては、クロモゲン溶液と唾液と一緒に混合して次に基質溶液を加えるといったように、反応は過酸化水素基質と唾液との接触によって開始される。

検定の終点は個々の使用する検定条件に依存することが明かである。例えばクロモゲン及び又は基質の濃度を最適まで増加すると色の形成を強め、即ち反応によって造られた色を観察するのに要する時間が短くなる。従って、都合のよい期間内に終点が観察されるように、与えられたパラメーター範囲内でクロモゲンと基質の濃度を有利なように調整することが出来る。知らぬ知識のある検定の実施をするものによってそのような調整は全て容易に明かとなり簡単に達成できる。

クロモゲンと基質の最少濃度はより長い、例えば1時間を超える検定時間を要するかもしれないが、一般に以下に示された好ましい濃度から最大

の濃度範囲迄の使用が、約 2~約 60 分内、好ましくは約 5~約 30 分、室温 (20~28℃) で好ましい検定を与えることが分かった。この時間に反応混合物の色の強さ (桃色~赤) が観測される。約 45℃迄の緩やか高温 (即ちパーオキシダーゼ酵素の不活性化温度以下) も反応速度を強めるために使用できる。

色形成の無いことは正常の状態即ち RBC 白血球が唾液中に無い事を示し、従って歯根膿の病気の無いことを示す。色の形成はこれに対し歯根膿の病気の存在と相関しその強さは病気の強さに相関する。都合のよい得点システム 1~4 は次の通りである。

- 1 = 正常 色発生なし
2 = 穏やか ピンク
3 = 中程度 桃色がかった赤
4 = ひどい 赤

クロモゲン溶液は 4-アミノアンチピロクロモゲン、フェノール結合剤及び適当な緩衝液、好ましくは慣用のアルカリ金属 (ナトリウム又はカリ

ウム) フォスフェート緩衝液からなり、約 4~9 好ましくは 6.8±0.05 の値を pH を反応条件の為に得る。

クロモゲン溶液		
成分		
	範囲	好適
4-アミノアンチピリン	0.001-0.15g	0.068g
フェノール	0.015-1.5g	0.55g
KH ₂ PO ₄	0.15-12.0g	5.98g
(モノベーシック)		
K ₂ HPO ₄	0.15-13.0g	6.27g
(ジベーシック)		
水 (十分量)	100 ml	100 ml

過酸化水素基質溶液は好ましくは過酸化水素の希釈水溶液である。

基質溶液

成分		
	範囲	好適
過酸化水素 (30%)	0.001-10 ml	0.1 ml
水 (十分量)	100 ml	100 ml

一般に本発明の方法は約 2~15 単位容量のクロ

モゲン溶液と約 0.1~2 単位容量の基質溶液を唾液単位容量当りに使用する。最適効率の量はクロモゲン及び/又は基質及び試験に使用する特定の検定技術によって変化する。そのような技術は以下により詳しく記載されるように試験管、充填物当て物セクション、磁器ウェル、分光光度計などを含む。上記の好ましいクロモゲン及び基質溶液で我々は約 2 単位容量のクロモゲン溶液と基質溶液が唾液単位容量当りに試験管又は磁器ウェルを使用するときに好ましいことを見つけた。また充填物当て物セクション (例えばディスク) を使用する時には唾液単位容量当りに約 2 単位容量のクロモゲン溶液及び 1 単位容量の基質溶液が、そして分光光度計装置を使用するときは、唾液単位容量当りに約 15 単位容量のクロモゲン溶液と 0.1 単位容量の基質溶液を使用することが好ましいことを発見した。

首尾一貫して信頼のおける色形成を得るために pH 及び過酸化水素濃度は制御されなくてはならない。例えば硝酸塩 (好ましい)、フタル酸塩、クエン

酸塩、トリス、ほう酸塩、こはく酸塩、などの緩衝液が使用でき、pH の値及びその能力は反応混合物が約 4.0~約 9.0 好ましくは約 6.8 の pH の値を有するような方法で選ばれる。クロモゲン溶液及びパーオキサイド基質溶液を混合するときは、クロモゲン溶液中、約 1.1×10^{-4} モル~約 188 モルの 4-アミノアンチピリン及び約 1.1×10^{-3} モル~約 3.5×10^{-3} モルのフェノールを過酸化水素モル当りに使用するのが好ましい。これらの反応体の当量比は、基質溶液中の過酸化水素のモル当り、クロモゲン溶液中の 4-アミノアンチピリン約 0.031~約 0.075 モル、及びフェノール約 0.55 モル~約 1.3 モルである。

本発明の方法はクロモゲン溶液の為に栓をした試験管、パーオキシド溶液の為に柔軟な密封した小瓶又は他のストッパー試験管などの気密の容器及び唾液試料のための目盛りを付けた点検器を与える都合よい試験キットの形態で使うことができる。この試験キットは十分な量の緩衝化されたクロモゲン溶液及びパーオキシド溶液を単一試

験の為に合んでいる事ができる。試験を行なうにあたりパーオキシド溶液は単にクロモゲン溶液に試験管中で加えられ、その後唾液の計った試料、即ち試験に十分な量の測定値に目盛りをつけた点滴器中で予め集めておいた唾液が加えられる。試験管は次に再び栓がされ振とうされ、そして次に示された時間の間隔で放置される。色反応が完了したのち、生じる色形成が即座にキット中に与えられている色インジケータチャートと比較でき、それから炎症性の歯根膜の病気の存否及びひどさが決定出来るように、試験管を位置させる手段がキット中に与えられる。

別の方法は磁器ウェルを使用することを含み、これは小容量の反応体検定を実施し、また検定色結果を観測する為の白色の背景を与える素晴らしい容器を提供する。また適当な吸収材料の使用、例えば市販されているフィルター支持パッドであって都合のよい形に切断されているもの、例えばディスクも素晴らしい、このディスクはその上に乗っている反応体を漏らすことなく保持し、それ

ては予め指示を与えなかった。各患者は唾液集め管に一度唾液を吐くように頼まれた。唾液試料の各々は分析されて次の二つの方法によってパーオキシダーゼ酵素の存在を検出した。両方の試験方法から得た色の記録の間では有意義な差異は見いだされなかった。

A. ディスク方法

マサチューセッツベッドフォードのミリポコーポレーションから市販されているフィルター支持パッドから1/4 張の吸収剤ディスクを用意し AP 10-037 00 とした。このパッドはペトリ皿の底に接着裏打ち材によって間隔をおいて固定した。試験反応は室温で次の方法で実施された。

- 20マイクロリットルの前に記載した好ましいクロモゲン溶液を各ディスクに適用した。
- 10マイクロリットルの前に記載した好ましい基質溶液を各クロモゲン処理ディスクに適用した。
- 10マイクロリットルの唾液試験試料をこのように処理したディスクに適用しこれによって試験反応を開始した。

特開昭60-222768 (4)

から検定色結果を容易に識別できる。そしてまた自動的に試験検定溶液を色読み取る慣用の分光光度計装置の使用もよい。

次の実施例は本発明を説明する目的で与えられている。

実施例 I

この検定から得られたインビトロの結果を得られる臨床結果と比較し相関させる為に、三つの独立した臨床試験を三人の研究歯科医で行なった。各患者は臨床歯根膜病の存否及びその随さを測定するために臨床的に調べられた。各臨床診断の結果は1 (正常) から4 (ひどい) まで記録された。全部で127 人の男及び女の患者が三つの試験に参加し、これを試験 I で85人の患者、試験 II で39人、そして試験 III で23人の患者として分割した。

試験 I で各患者は朝起きた後、およそ 5 ml の唾液を集める前にどんな口内衛生剤又は食物摂取も控えるように頼まれた。試験 II 及び III で唾液の試料を歯科医の所で、歯科処理の為に歯科患者から集め、口内衛生剤又は食物の摂取の禁止につい

d. 試験 I に於ける唾液適用の10分後、及び試験 II 及び III に於ける唾液適用の30分後唾液中のパーオキシダーゼ酵素の存在の有無を発生した色 (桃色〜赤) の存否及び強さを前記 1 ~ 4 のスケール上で記録した。

B. 試験管方法

試験反応は次の方法で室温で行なった。

- 50マイクロリットルの好ましいクロモゲン溶液を試験管中に置いた。
- 30マイクロリットルの唾液試験試料を加えた。
- 60マイクロリットルの好ましい基質溶液を加えて反応を開始した。
- (ディスク方法の段階 d. と同じである)

三つの試験に於ける臨床診断の結果及び127 人患者の各々のインビトロの唾液検定の結果は表 1、2、及び 3 に示されている。

特開昭60-222768(5)

表 1 試験 I (65人の患者)

患者	臨床	インビトロ	患者	臨床	インビトロ	患者	臨床	インビトロ	患者	臨床	インビトロ
No	得点	得点	No	得点	得点	No	得点	得点	No	得点	得点
1	1	1	18	3	3	35	3	3	52	1-2	1
2	2	2	19	1	4	36	2	2	53	1	2
3	2	3	20	2	2	37	1-2	1	54	1	2
4	2	2	21	3	3	38	2	4	55	1	2
5	2	2	22	4	4	39	2	4	56	1-2	1
6	2	2	23	1-2	3	40	2	3	57	2-3	2
7	2	2	24	2	4	41	3	2	58	2	1
8	4	3	25	2	2	42	1-2	2	59	1-2	2
9	3	3	26	1	1	43	2	2	60	2	2
10	2	3	27	2	2	44	1	1	61	3	4
11	3	2	28	1	4	45	1-2	1	62	2	2
12	1-2	1	29	2	2	46	2	2	63	1-2	2
13	2	2	30	1-2	3	47	1	1	64	1-2	2
14	3	4	31	1	1	48	3	4	65	1	2
15	1	2	32	1	2	49	1-2	2			
16	2	1	33	2	2	50	1-2	1			
17	3	2	34	3	4	51	1	1			

表 2 試験 II (39人の患者)

患者	臨床	インビトロ	患者	臨床	インビトロ	患者	臨床	インビトロ
No	得点	得点	No	得点	得点	No	得点	得点
1	3	4	18	3	4	35	2-3	2
2	3	1	19	4	2	36	1	2
3	2	2	20	3	4	37	1	2
4	3	2	21	2-3	4	38	1	1
5	4	2	22	2	4	39	2	3
6	3	2	23	3-4	3			
7	2-3	3	24	1	2			
8	2	2	25	2	2			
9	3-4	2	26	1-2	2			
10	4	4	27	2	2			
11	3-4	1	28	4	4			
12	3	2	29	2	2			
13	3	2	30	2	4			
14	1	1	31	1	2			
15	1	2	32	3-4	2			
16	1	2	33	2	2			
17	2	3	34	1	1			

特開昭60-222768 (6)

次の表IVは前の結果をまとめたものである。

表 3 試験 III (23人の患者)

患者 No	臨床 得点	インビトロ 得点	患者 No	臨床 得点	インビトロ 得点
1	3	1	18	1	2
2	2	3	19	1	2
3	2	1	20	1	3
4	3	2	21	1-2	3
5	3	2	22	1	4
6	4	3	23	1-2	3
7	2-3	2			
8	3	2			
9	2	2			
10	3	4			
11	2	3			
12	2-3	3			
13	3-4	4			
14	1-2	2			
15	1-2	2			
16	1-2	2			
17	1	2			

表 4 まとめ

	臨床及び インビトロ 試験での 歯根膜病 の存在	偽陽性： インビトロ 試験での 歯根膜病 の存在	偽陰性： 臨床試験 での歯根 膜病の存 在
I (N=65)	73.8%	12.3%	13.8%
II (N=39)	79.5%	15.5%	5.1%
III (N=23)	69.6%	21.7%	8.7%

* インビトロ試験はパーオキシゲナーゼ酵素の存在を示し表面下の低水準の歯根膜炎症症状を顕現した。しかし試験した際に炎症の臨床的な兆候は明らかにはみえなかった。「偽陽性」は臨床試験得点が1のときかつインビトロ試験得点が1より大きいときである。

** 臨床試験は歯茎の炎症を記録した。しかしインビトロの試験はパーオキシゲナーゼ酵素の存在を顕現しなかった。「偽陰性」はインビトロ試験の得点が1であり、かつ臨床試験の得点が1よりも大

きいときである。

手 続 完 了 証 書

昭和60年4月18日

特許庁長官 志 賀 孝 昭

1 事件の表示 昭和60年特許第035409号

2 発明の名称 歯根膜の病気の検出のための診断試験

3 修正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国06897コネチカット州ウィルトン ウェストポートロード10

氏名(名称) リチャードソン・ヴィックス インコーポレーテッド

4 代理人

住 所 東京都新宿区新宿2丁目8番1号新西セブンビル303号

(GOO)氏 名 弁護士 佐々井弥太郎
電話364-1285~6

5 修正命令の日付 自発修正

6 修正により増加する発明の数 増加せず

7 修正の対価 発明の詳細な説明の対価

8 修正の内容

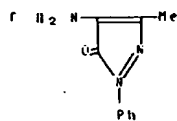
出 願 人 リチャードソン・ヴィックス

インコーポレーテッド

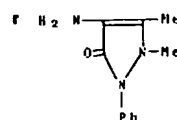
代理人 弁護士 佐々井弥太郎
(他1名)

特開昭60-222768(7)

明細書5頁7行

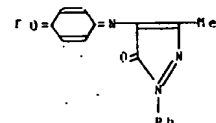


」を

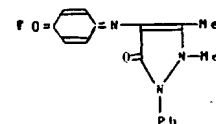


」に訂正する。

明細書5頁下から4行



」を



」に訂正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.